Tome 41, nº 21. — Juin 1934.

Mitgeteilt an der Generalversammlung der schweizerischen zoologischen Gesellschaft in Bern, den 10. und 11. März 1934.

Ueber die Verwendbarkeit des Dioxans an Stelle von Alkohol bei der histologischen Verarbeitung nilblaugefärbter Embryonalgewebe.

von

F. E. LEHMANN und V. de ROCHE

(Zoologisches Institut der Universität Bern.)

Im Verlauf der letzten 6 Jahre sind verschiedene Methoden ausgearbeitet worden, mit deren Hilfe es möglich ist, mit Nilblau intravital gefärbtes Gewebe unter Erhaltung des Nilblau zu konservieren und histologisch zu verarbeiten. (Methoden von Adams, Fyg-Baltzer und Lehmann, vergl. die Zusammenstellung in Romeis, *Taschenbuch der mikroskopischen Technik*, 13. Auflage 1932.) Da die Weiterbehandlung der fixierten Objekte mit sublimatgesättigten Alkoholen nach Fyg-Baltzer oder, im Falle der mit Phosphorwolframsäure behandelten Objekte, die Verwendung reiner Alkoholreihen nicht in jeder Hinsicht befriedigte (hohe Giftigkeit des Sublimats im einen, und eine, wenn auch sehr langsame Löslichkeit der mit Phosphorwolframsäure erzeugten Niederschläge im anderen Falle), so wurde eine weitere Verbesserung der Methoden angestrebt.

I. *Fixierung und Einbettung mit Nilblau vital gefärbter Objekte.* (F. E. Lehmann).

Weitere Versuche zielten darauf hin, die Alkoholreihe durch ein anderes organisches Lösungsmittel zu ersetzen. Den Anforderungen entsprach weitgehend das Dioxan (Diaethylendioxyd), das durch Graupner und Weissberger (Zool. Anz. Bd. 96, S. 204-206, 1931) zum ersten Male in die Mikrotechnik eingeführt wurde (vergl. auch

Romeis l. c. Seite 93 ff). Es ist sowohl mit Wasser, als auch mit Benzol und Paraffin mischbar. Hergestellt wird es von der I. G. Farbenindustrie in Deutschland. Es ergab sich, dass die mit Phosphorwolframsäure erzeugten Nilblaufällungen in Dioxan unlöslich sind. Aus diesem Grunde lässt sich bei dem von F. E. Lehmann angegebenen Verfahren Dioxan mit Vorteil an Stelle von Alkohol verwenden. Bei der Behandlung vitalgefärbter Tritonkeime ist zu beachten:

1. Dass die Fixierung in Zenker ohne Eisessig genügend lange dauert (2-3 Stunden), da bei ungenügender Fixierung nachträgliche Farbverlagerungen auftreten können.

2. Dass die Wässerung, die auf die Fixierung folgt, in fliessendem Wasser vorgenommen wird (2-3 Stunden), da ungenügende Wässerung später schlechte Färbbarkeit und Auftreten von Kristallen bedingt.

3. Dass nach dem Einlegen in 2 % Phosphorwolframsäure, das 2-12 Stunden dauern kann, wieder gründlich in Leitungswasser ausgewaschen wird und zwar entsprechend der Vorbehandlung 2-8 Stunden. Aus dem Wasser erfolgt die Ueberführung in ein Gefäss mit Dioxan I, dessen Boden mit wasserfreiem $CuSO_4$ bedeckt ist. Das Kupfersulfat dient zum Entzug des gelösten Wassers und soll, sobald es infolge der Wasseraufnahme grünlich wird, gewechselt werden. In den zwei folgenden Dioxangefässen II und III befindet sich am Boden wasserfreies Calciumchlorid, das ebenfalls gewechselt werden muss, sobald es beginnt, seine Form zu verlieren und durchsichtig zu werden. Aufenthalt des Objektes in jeder Dioxanstufe ca 1 Stunde. Die Objekte liegen zweckmässig auf einem Rost in der oberen Flüssigkeitszone. Einbettung über Benzol (10-15 min.) und Paraffin (10-15 min). Die Schneidbarkeit der Objekte ist nach der Dioxanbehandlung gut.

II. *Färbung der Schnitte.* (V. de Roche).

1. Entparaffinierung der Schnitte in Xylol (15 min.) dann Benzol I (30 min.).
2. Entsublimieren der Schnitte:
   Jodbenzol I (30 min.).
   Jodbenzol II (30 min.).

3. Auswaschen des überschüssigen Jods:
   Benzol II, Benzol III (je 30 min.).
4. Ueberführen in Wasser:
   Benzol-Dioxan 1:1 (15 min.), Dioxan (15 min.), dest. Wasser (30 min.).
   Zu langes Stehenlassen der Schnitte in Dioxan (mehrere Stunden) bewirkt, dass sich auch das Plasma bei der Anwendung einer reinen Kernfarbe stark mitfärbt. Soll dies vermieden werden, darf die angegebene Zeit nicht überschritten werden.
5. Färbung mit Säurealizarinblau konz. (3-4 min.) (während Färbung kontrollieren ! ! !).
   Herstellung des Säurealizarinblau: 10 gr chem. reines Aluminiumsulfat, 0,5 gr Säurealizarinblau, 100 ccm dest. Wasser. Kochen bis Farbstoff gelöst. Nachher wieder auf 100 ccm auffüllen. Filtrieren. Diese Lösung wird direkt zur Färbung verwendet. Kernfärbung kräftig rotviolett.
   Auswaschen in dest. Wasser I und II (je 15 min.).
6. Ueberführung in Benzol: Dioxan I, II, III (je 20 min.).
   Jedes Gefäss mit Dioxan muss ein Entwässerungsmittel enthalten: Dioxan I Kupfersulfat wasserfrei, Dioxan II und III Calciumchlorid wasserfrei. Wechsel der Entwässerungsmittel, wie oben angegeben.

Die mit dieser Methode hergestellten Schnittpräparate sind weitgehend ähnlich denjenigen, die nach der Methode von Fyg-Baltzer oder Lehmann angefertigt wurden. Als Träger des Nilblau erscheinen in erster Linie die primären Pigmentkörnchen, die grünblau gefärbt sind. Die Kerne zeigen eine kräftige violette Färbung, während das Plasma in einem schwachen violetten Farbton erscheint.